

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Д.В. Моисеев, А.И. Жебентяев,
П.Т. Петров¹, Л.П. Губина¹, Т.В. Трухачева¹

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ ПРИ КОНТРОЛЕ КАЧЕСТВА АЦИКЛОВИРСОДЕРЖАЩИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

¹ Научно-фармацевтический центр РУП
«Белмедпрепараты»
Витебский государственный
медицинский университет

Разработана простая и экспрессная методика ВЭЖХ определения ацикловира в ЛС. Определение ацикловира проводится на обращенно-фазовой колонке (Zorbax SB C-18, 250×4,6 мм, 5 мкм) с изократическим режимом элюирования 0,01 М дигидрофосфатом калия (рН=5,0), содержащим 5% ацетонитрила (по объему). Градуировочный график для ацикловира линейен в пределах 10-200 мкг/мл (RSD% <1%); для гуанина 0,1-10 мкг/мл (RSD% <5%).

Ацикловир (9-[2-гидроксиэ-токсиметил]-9Н-гуанин) является ациклическим аналогом природного нуклеозида – 2'-дезоксигуанидина. На протяжении многих лет ацикловир занимает ведущее место в лечении инфекций, вызванных вирусом простого герпеса (ВПГ) типов 1 и 2. Механизм его противогерпетического действия основан на ингибировании синтеза вирусной ДНК. После проникновения в пораженную ВПГ клетку ацикловир под влиянием вирусной тимидинкиназы превращается в ацикловир-монофосфат, который при участии клеточных ферментов последовательно превращается в ацикловир-дифосфат и ацикловир-трифосфат. Ацикловир-трифосфат избирательно блокирует сборку вирусной ДНК, при этом практически не влияя на репликацию ДНК клетки человека.

Анализ ацикловира и гуанина, главной примеси при синтезе субстанции и одного из продуктов деструкции ацикловира, описан в нормативной документации на

лекарственные средства ацикловира. Определение посторонних примесей обычно проводится хроматографическими методами: тонкослойной хроматографии [1, 2, 8, 9, 14] или методом ВЭЖХ [3-6, 10, 14, 15]. В таблице 1 приведены основные условия определения ацикловира в лекарственных средствах методом ВЭЖХ.

При выполнении анализа ацикловирсодержащих лекарственных средств методом ВЭЖХ чаще всего используются подвижные фазы со значением рН 3,5 и меньше. Однако при таких значениях рН подвижной фазы основная примесь ацикловирсодержащих лекарственных средств – гуанин – находится в двух формах (протонированной и непротонированной – показатель константы кислотности гуанина равен 3,3) и, следовательно, на хроматограмме гуанин может присутствовать в виде двух пиков. Также, при использовании подвижной фазы без органического модификатора снижается ресурс хроматографической колонки с привитыми гидрофобными группами.

Целью настоящей работы являлась разработка методики контроля качества (качественное и количественное определение ацикловира и его основных примесей) лекарственных средств, лишенной перечисленных выше недостатков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа выполнялась на жидкостном хроматографе фирмы Agilent HP 1100, в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G1311A, диодно-матричным детектором G1315B, термостатом колонок G1316A, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G1313A. Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения проводилась с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D.

Разделение проводилось на хроматографической колонке Zorbax StableBond C-18 250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Подвижная фаза: 0,05 М раствор дигидрофосфата калия рН=5,0 и ацетонитрил в со-

отношении 95:5 (по объему), скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин, объем пробы 10 мкл. Рабочая длина волны 254 нм выбрана на основании анализа спектров поглощения в области максимумов пиков определяемых веществ. Разделение проводилось при температуре колонки 40°C, давление в системе около 70 bar.

В качестве рабочего стандартного раствора использовали раствор, содержащий 0,1 мг/мл ацикловира и 0,7 мкг/мл гуанина. Срок годности данного раствора 1 месяц при температуре хранения 2-8 °С.

Таблица 1

Основные хроматографические условия определения ацикловира

Форма выпуска	Хроматографическая колонка	Подвижная фаза	Скорость подачи ПФ, мл/мин	Инжектируемый объем, мкл	Литература
Мазь	Nucleosil C-18 (250×4, 5мкм)	ледяная уксусная кислота и вода (0,25:99,75)	1,5	20	[10]
Таблетки, мазь	Supelco LC-18 (250×4,6, 5 мкм)	0,01 М дигидрофосфат натрия (рН=3,5) по фосфорной кислоте и ацетонитрил. Градиентное элюирование от 5% до 25% ацетонитрила за 20 мин	1,0	20	[3,5]
Субстанция, таблетки, суспензия, мазь, инъекции, капсулы	C-18 (300×4,2), C-18 (250×4,6)	0,02 М уксусная кислота	1,0-3,0	20-50	[15]
Субстанция	C-18 (100×4,6, 3 мкм)	6,0 г дигидрофосфата натрия и 1,0 декансульфоната натрия в 900 мл воды (рН=3 по фосфорной кислоте), 40 мл ацетонитрила, довести до 1000 мл	2,0	20	[14]

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке методики использовались рекомендации, приведенные в литературе [6,11-15]. Рассчитанные значения относительных стандартных отклонений (RSD%) для пика основного вещества – ацикловира - не превышают 1% (10 - 200 мкг/мл), для примеси – гуанина - не превышают 5% (0,1-10 мкг/мл), т.е. находятся в пределах, рекомендованных для количественного анализа ЛС [11]. Значения коэффициентов разделения (α) и разрешения (R_s) для двух соседних пиков указывают на хорошее разделение соответствующих веществ (таблица 2).

Оценка устойчивости аналитической системы к небольшим изменениям условий хроматографирования (робастность методики)

При разработке методики анализа было изучено влияние следующих параметров: изменение содержания органического растворителя в элюенте ($\pm 2\%$); изменение рН буферного раствора ($\pm 0,5$) и температуры колонки ($\pm 5^\circ\text{C}$). В таблице 3 приведены времена удерживания при изменении перечисленных параметров.

Таблица 2

Хроматографические параметры для ацикловира и гуанина

	Время удерживания (t_R)	Эффективность разделения (N)	Коэффициент асимметрии пика (A_S)	Селективность разделения (α)	Коэффициент разделения пиков (R_s)
Гуанин	3,14	~ 4.000	0,9-1,2	~1,2	~3,7
Ацикловир	3,72	~ 15.000	0,8-0,9		

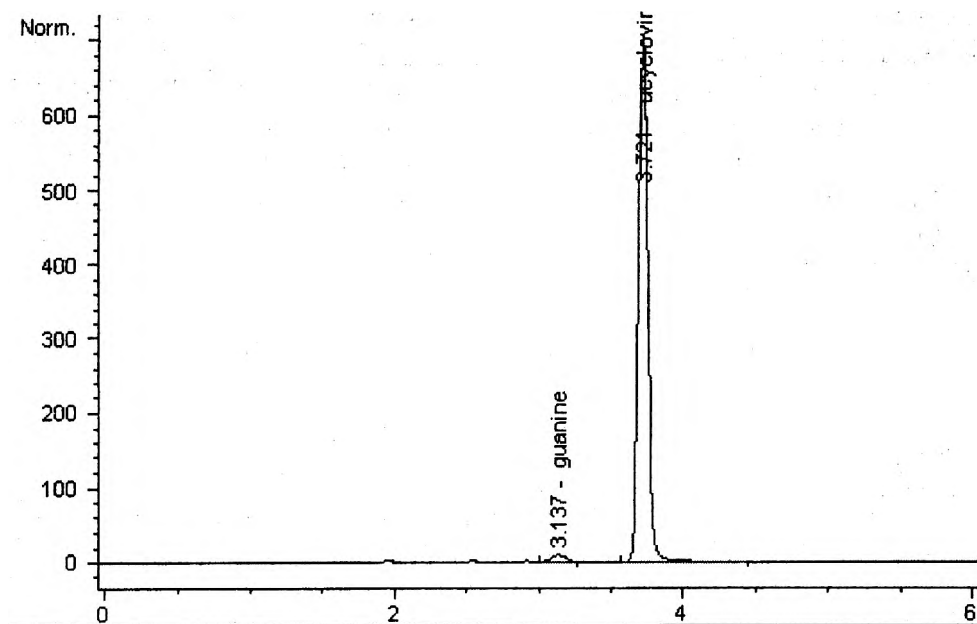


Рис. 1. Хроматограмма мази ацикловира 5% (производитель ЗАО «Вертекс», Россия).

Таблица 3

Влияние различных параметров на время удерживания ацикловира и гуанина

	Содержание органического модификатора, %			Значение pH			Температура, °C		
	3	5	7	4,5	5,0	5,5	35	40	45
Время удерживания ацикловира, мин.	4,95	3,72	3,12	3,70	3,72	3,69	3,88	3,72	3,65
Время удерживания гуанина, мин.	3,39	3,14	2,75	3,11	3,13	3,12	3,20	3,14	2,99

Как видно из таблицы 3, наибольшее влияние на время удерживания оказывает концентрация органического модификатора, высота пика при этом составляет около 77% (при концентрации ацетонитрила в ПФ 3%) и 154% (при концентрации ацетонитрила в ПФ 7%) от высоты пика при концентрации ацетонитрила в ПФ 5%. При понижении температуры разделения на 5°C высота пика снижается (до 94%), при повышении на 5°C увеличивается (до 104%) от высоты пика при 40°C. Изменение значения pH ПФ не оказывает заметного влияния на высоту пика. Таким образом, при обработке результатов измерения предпочтительнее использовать значения площадей пиков веществ, т.к. площадь пика при изменении данных параметров остается неизменной.

Проверка линейности зависимости величины отклика детектора от концентрации определяемого вещества

Градуировочный график линейен при концентрациях ацикловира 10–200 мкг/мл. Относительное стандартное отклонение RSD% (для n=5) при содержании ацикловира 100 мкг/мл (концентрация PCO) составляет 0,21%, при других концентрациях RSD% не превышает 1%. Относительное стандартное отклонение (для n=5) при содержании гуанина 1 мкг/мл (т.е. концентрация, близкая к допустимой норме содержания гуанина как примеси в PCO) составляет 1,02%, при других концентрациях RSD% не превышает 5%. Линейное уравнение для расчета содержания гуанина во вводимой пробе имеет вид:

$$C_{\text{гуан}} = 0,3221 \cdot S_{\text{гуан}} - 1,4475 (R=0,9993).$$

Градуировочный график для расчета содержания ацикловира приведен на рис.2.

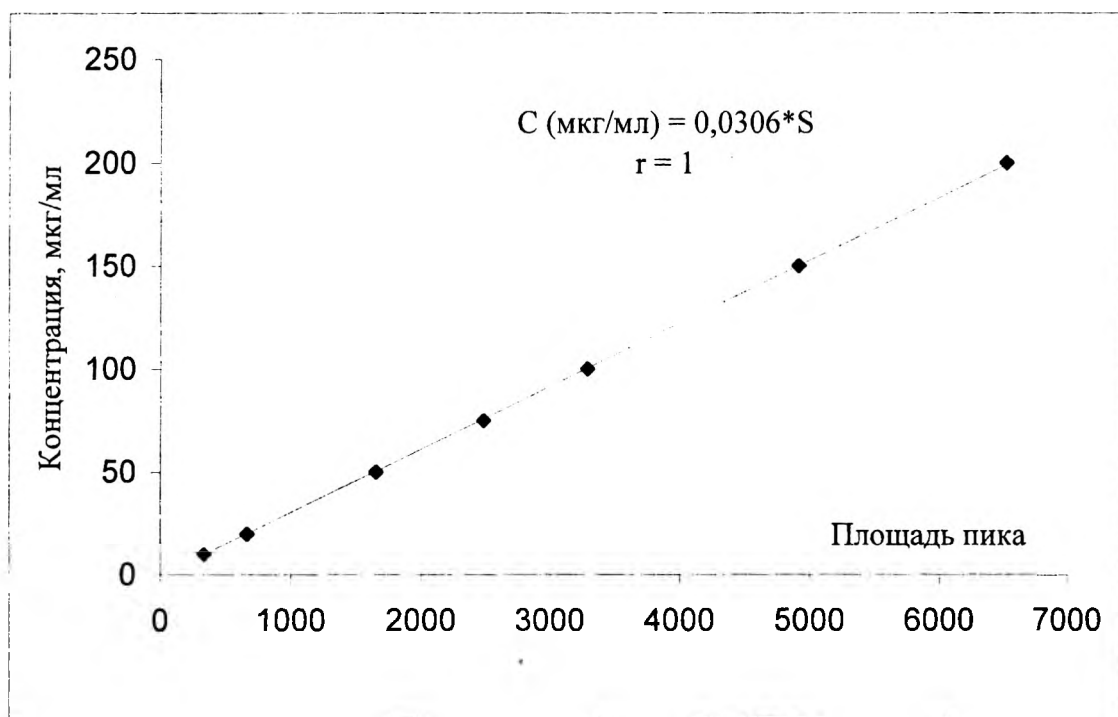


Рис. 2. Градуировочный график для расчета концентрации ацикловира по площади пика

Пробоподготовка

1. Определение ацикловира в мазевых формах

Точную навеску мази, содержащую в пересчете около 0,1 г ацикловира (2 г – 5% мази или 4 г – 2,5%), помещают в химический стакан вместимостью 50,0 мл,

прибавляют 20,0 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида и выдерживают на водяной бане при температуре $(60 \pm 5)^\circ\text{C}$ в течение 15 минут, периодически помешивая. Содержимое стакана переносят в мерную колбу вместимостью 200,0 мл, доводят объем раствора водой очищенной, предваритель-

но нагретой до 60°C, тщательно перемешивают, охлаждают до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки водой и фильтруют (белая лента). 10 мл профильтрованного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, доводят объем раствора до метки 0,01 М раствора натрия гидроксида, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

2. Определение ацикловира в таблетках

Растирают в ступке 10 таблеток. Около 0,41 г (точная навеска) порошка таблеток помещают в мерную колбу вместимостью 200,0 мл, прибавляют 20,0 мл 0,1 М гидроксида натрия, встряхивают в течение 15 минут, доводят объем раствора до метки водой очищенной и фильтруют (белая лента). 5 мл профильтрованного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, доводят объем раствора до метки 0,01 М раствора натрия гидроксида, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

3. Приготовление рабочего стандартного образца (РСО) ацикловира

Около 0,1000 г ацикловира (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 200,0 мл, прибавляют 20,0 мл 0,1 М раствора натрия гидроксида, взбалтывают до растворения и доводят объем раствора водой очищенной. 10 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, доводят объем раствора до метки 0,01 М раствора натрия гидроксида, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм, отбрасывая первые 10 мл фильтрата.

По 10 мкл испытуемого раствора и раствора РСО попеременно хроматографируют на жидкостном хроматографе, получая не менее 5 хроматограмм для каждого раствора.

Обработка результатов измерений

1. Расчет количественного содержания ацикловира

Количественное содержание ацикловира в мазях и таблетках находят по формулам:

$$\omega_{\text{мазь}} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 100\%}{S_0 \cdot m_1}$$

$$m_{\text{табл}} = \frac{S_1 \cdot m_0 \cdot 2 \cdot b}{S_0 \cdot m_1}$$

где:

S_1 – среднее значение площадей пиков ацикловира, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

S_0 – среднее значение площадей пиков ацикловира, вычисленное из хроматограмм стандартного раствора;

m_1 – масса навески препарата в граммах;

m_0 – масса навески ацикловира в РСО;

b – средняя масса одной таблетки ацикловира.

2. Расчет количественного содержания примесей

Количественное содержание примеси гуанина в ацикловире (время удерживания пика гуанина на хроматограмме испытуемого раствора должно совпадать со временем удерживания пика гуанина на хроматограмме стандартного раствора) в мазях и таблетках находят по формуле:

$$\omega_{\text{гуан}} = \frac{S_{\text{гуан}} \cdot 0,9 \cdot 100\%}{S_{\text{общ}}}$$

где:

$S_{\text{гуан}}$ – среднее значение площадей пиков гуанина, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

$S_{\text{общ}}$ – среднее значение суммы площадей всех пиков на хроматограмме, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

0,9 – фактор отклика детектора для гуанина по отношению к ацикловиру.

3. Содержание прочих примесей рассчитывается по формуле:

$$\omega_{\text{прим}} = \frac{S_{\text{прим}} \cdot 100\%}{S_{\text{общ}}}$$

где:

$S_{\text{прим}}$ – среднее значение суммы площадей всех пиков примесей, кроме гуанина, на хроматограмме, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора;

$S_{\text{общ}}$ – среднее значение суммы площадей всех пиков на хроматограмме, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора.

Результаты анализов ацикловир-содержащих ЛС методом ВЭЖХ

Разработанная методика была испытана при анализе ЛС различных производителей: мазь ацикловира 5% - ОАО

«Нижфарм» серия 10205, ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга» серия 171204, ЗАО «Вертекс» серия 030205; мазь ацикловира 2,5% - ОАО «Киевмедпрепарат» серия 200305; таблетки ацикловира 0,2 г – ОАО «Фармакон» серия 10405. Результаты количественного содержания ацикловира в мазях и таблетках, рассчитанные по градуировочному графику и по отношению площадей пиков исследуемых образцов и РСО, не отличались друг от друга по t - критерию ($P=0,95$; $n=5$). Результаты анализов представлены в таблице 4 ($P=0,95$, $n=5$).

Таблица 4

Содержание ацикловира и гуанина в лекарственных средствах различных производителей

Наименование ЛС	Производитель	Содержание ацикловира, %	RSD %	Содержание гуанина от ацикловира, %	RSD %
Мазь ацикловира 5%	ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга»	4,51±0,03	0,44	0,54±0,02	2,30
Мазь ацикловира 5%	ЗАО «Вертекс»	4,81±0,05	0,90	1,71±0,11	5,26
Мазь ацикловира 5%	ОАО «Нижфарм»	4,75±0,10	1,63	0,62±0,01	1,51
Мазь ацикловира 2,5%	ОАО «Киевмед-препарат»	2,67±0,02	0,72	0,65±0,03	4,15
Таблетки ацикловира 0,2 г	ОАО «Фармакон»	0,196±0,002	0,86	0,45±0,03	5,12

Как видно из таблицы 4, по содержанию действующего вещества все лекарственные средства соответствуют нормативной документации (содержание действующего вещества в мазях должно составлять 90-110% от регламентируемого, в таблетках 95-105%). Относительное стандартное отклонение результатов определения не превышало рекомендуемых 2% для действующего вещества и 10% для определения примесей.

Таким образом, разработанная методика контроля качества ацикловирсодержащих лекарственных средств отличается высокой точностью, воспроизводимостью и эффективностью и позволяет уве-

личить ресурс хроматографической колонки без потери качества анализов.

ЛИТЕРАТУРА

1. ВФС 42-2723-96 мазь ацикловир-АКРИ.
2. ВФС 42-2778-96 субстанция ацикловира.
3. ВФС 42-2884-97 мазь ацикловира 5%.
4. ВФС РБ 0552-2001 таб. ацикловира 0,2 г.
5. ВФС 42-2779-96 таб. ацикловира 0,2 г.
6. Моисеев Д.В., Жебентяев А.И., Петров П.Т. Влияние состава подвижной фазы на хроматографические характеристики

- ки производных пуринов и пиримидинов при ОФ ВЭЖХ// Вестник фармации – 2005, №1. – С. 20-26.
7. Петров П.Т., Трухачева Т.В., Моисеев Д.В., Жебентяев А.И. Определение пуриновых оснований с противогерпетической активностью методом ВЭЖХ// Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, №7. – С. 44-53.
 8. ФС-42Б-2468-96 Виролекс глазная мазь 3% (KRKA).
 9. ФС-42Б-2466-96 Виролекс в/в инъекции (KRKA).
 10. ФС 42Б-380-99 мазь ацикловира 5%.
 11. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидации) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе// Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – т. 38, №4. – С. 40-56.
 12. Эпштейн Н.А. Оценка максимально допустимых значений относительного стандартного отклонения площадей (высот) пиков при количественном анализе субстанций методом ВЭЖХ Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – т. 37, №11. – С. 45-46.
 13. Эпштейн Н.А. Оценка предела количественного определения с учетом требований к воспроизводимости результатов максимально допустимых значений относительного стандартного отклонения площадей (высот) пиков при количественном анализе субстанций методом ВЭЖХ// Химико-фармацевтический журнал. – 2002. – Т. 36, №11. – С. 52-54.
 14. British Pharmacopeia, London (2001).
 15. The United States Pharmacopeia, (The USP 24th Ed.), Easton, Rand Mc Nally: Tounton, MA, 2000.
- SUMMARY*
- Moiseev D.V., Zhebentayev A.I., Petrov P.T., Gubina L.P., Trukhacheva T.V.
- DETERMINATION OF ACYCLOVIR IN PHARMACEUTICAL FORMULATIONS BY HPLC**
- Fast and simple procedure for the determination of the acyclovir in pharmaceutical preparations by HPLC is described. A reversed-phase column (Zorbax SB C-18, 250x4,6 mm, 5 mcm) with isocratic elution by 0,01 M potassium phosphate buffer (pH=5,0) containing 5% acetonitrile (v./v.) is used to separate acyclovir. The calibration graph for acyclovir was linear from 10-200 mcg/ml (RSD <1%); graph for guanine was linear from 0,1-10 mcg/ml (RSD <5%).
- *****